

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

NÁSZ ISTVÁN

AZ ADENOVÍRUSOK
PATHOLÓGIAI
JELENTŐSÉGE
ÉS MOLEKULÁRIS
SZERKEZETE



69

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

ÉRTEKEZÉSEK
EMLÉKEZÉSEK

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

SZERKESZTI
TOLNAI MÁRTON

NÁSZ ISTVÁN

AZ ADENOVÍRUSOK
PATHOLÓGIAI
JELENTŐSÉGE
ÉS MOLEKULÁRIS
SZERKEZETE

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1986. FEBRUÁR 20.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982.
évi CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes és
levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak
napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtitkárának 22/1/1982.
számú állásfoglalása rendelkezett.

ISBN 963 05 4734 1

© Akadémiai Kiadó, Budapest 1988 — Nász István

Printed in Hungary

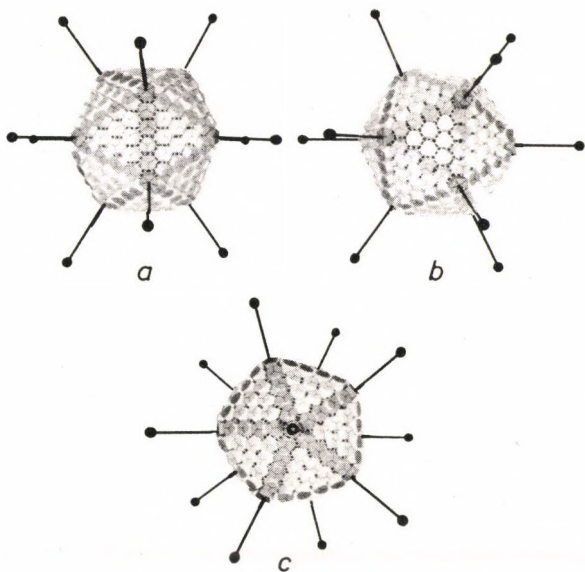
Az adenovírusok emberben elsősorban különböző légúti és szemészeti betegségeket okoznak és a tápcsatorna bizonyos megbetegedéseiért felelősek (I. táblázat). Szerepük lehet azonban több eddig nem tisztázott etiológiájú megbetegedésben és feltehetően a rosszindulatú daganatok kóroktanában is (1–8). Egyes szerológiai típusok ugyanis – elsősorban a 12-es, 18-as és 31-es típusok – újszülött kísérleti állatokban daganatot hoznak létre. Az akut

I. táblázat: Az adenovírusok által okozott betegségek

Kórkép	Vírustípus	Leggyakoribb előfordulás
Akut lázas pharyngitis	1, 2, 3, 5, 6, 7	csecsemők, kisgyermekek
Pharyngoconjunctivális láz	3, 4, 7, 14	iskolás gyermekek
Akut légúti betegség	3, 4, 7, 14, 21	katonai újoncok
Pneumonia	1, 2, 3, 4, 7	csecsemők
Keratoconjunctivitis epidemica	8, 11, 19, 37	minden korosztály
Pertussis syndroma	5	csecsemők, kisgyermekek
Akut haemorrhagiás cystitis	11, 21	csecsemők, kisgyermekek
Gastroenteritis	40, 41	csecsemők, kisgyermekek

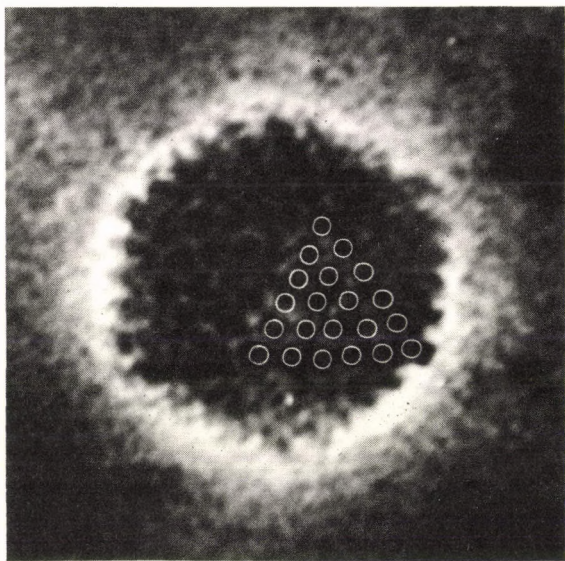
megbetegedéssel járó fertőzések mellett ismeretes, hogy bizonyos típusok, így az 1-es, 2-es, 5-ös és 6-os szerotípusok, látszólag egészséges egyének szervezetében jelen lehetnek hosszú ideig latens módon anélkül, hogy betegséget okoznának. Megfelelő körülmények között azonban ezek a latens, vagy endogén vírusok aktiválódhatnak és akut betegséget okozhatnak, ill. jelentősen súlyosbíthatják, fatálisá tehetik az egyéb kórképeket. Rendkívüli érdeklődésre tett szert ilyen vonatkozásban az utóbbi néhány évben egy eddig kevésbé ismert és alig tanulmányozott latens típus, a 35-ös szerotípus. Ezt ugyanis sikerült kitenyészteni AIDS-ben szenvedőkből, továbbá immun-suppresszív kezelésben részesültekből, csontvelő- és vesetranszplantáltak vizeletéből (9–10). Az ilyen betegek egy részénél bizonyítható volt az adenovírus okozta vesekárosodás, adenovírus hepatitis, ill. pneumonia, mint közvetlen halálok. Más betegeknél közvetlen kóroki szerep nem volt bizonyítható, az AIDS-ben sincs kóroki szerepük, de egyedülálló predilectios jelenlétük az immunhiányos vagy immun-suppresszált gazdáknak és aktiválódásuk az urogenitális rendszer területén feltétlenül magyarázatra, tisztázásra vár. Ezért az utóbbi években mi is vizsgálat tárgyává tettük több irányból a 35-ös típus különböző tulajdonságait.

Az adenovírusok szerkezetére jellemző, hogy ikozaéder alakúak (1., 2. ábra), átmérőjük kb.



1. ábra. Adenovírus modell az élközep-pont (a) a lapközep-pont (b) és a csúcs (c) felől nézve

80 nm és 252 morfológiai egységből, kapszomerből van felépítve fehérjeköpenyűk, a vírus kapszid. Ezek közül 12 helyezkedik el az ikozaéder 12 csúcsának megfelelően, 120–120 pedig annak élein és lapjain. A csúcsi kapszomerek és a belőlük radiálisan kiálló nyúlványok, végükön kis gömbszerű képződménnyel a pentonok, külön a nyúlványok neve: fiber. A lapokon és az éleken elhelyezkedő kapszomerek pedig a hexonok, melyek tulajdonképpen a vírus belsejében elhelyezkedő DNS mellett a jelen előadás főszereplői. Minden hexon

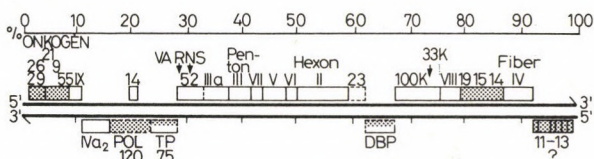


2. ábra. Az adenovírus elektronmikroszkópos képe. Egy háromszögű lapon a hexonokat körök jelzik

molekula három, kémiai azonos polipeptid alegységből épül fel. A hexon fehérjét sikerült nagyfokban tisztítanunk és két- és háromdimenziós kristályos formában előállítanunk. Ezeket elektronmikroszkóppal tanulmányozva finom összekötő elemek létezését mutattuk ki, meghatároztuk a hexonok egymáshoz való kötődési módját a kristályban és a vírusrészecskékben egyaránt, és megállapítottuk az összekötő elemek és a polipeptid alegységek kölcsönös orientációját. Ezzel sikerült meghatároznunk a vírus fehérjeburkának finomszerke-

zetét az ikozaéder alakú vírus 2-szeres, 3-szoros és 5-szörös szimmetriatengelyének megfelelően, amint azt a vírusmodell is szemlélteti (1. ábra). Megítélhető, hogy itt igen bonyolult térbeli, síkbeli és rotációs szimmetriaviszonyok meghatározásáról van szó (4, 11–17).

A 3. ábrán, az adenovírus DNS géntérképén, a különböző strukturfehérjék és polipeptidek,



3. ábra. Az adenovírus DNS géntérképe

továbbá a vírusszaporodási ciklus elején képződő, de vírus alkotórészként nem szereplő ún. korai fehérjéket kódoló gének helye látható. A két vízszintes párhuzamos vonal a duplaszálú lineáris DNS-t jelenti. Az onkogén, azaz a daganatkeltésért felelős génszakasz (a bal oldalon) továbbá a penton, a hexon és fiber gén helye jelölve van. Az arab és római számok az azonos jelű polipeptidek génjének a helyét jelzik azon a DNS-szálon, amelyen elhelyezkednek. A pontozás a korai, a „sima” kihúzás pedig a késői fehérjéket jelöli.

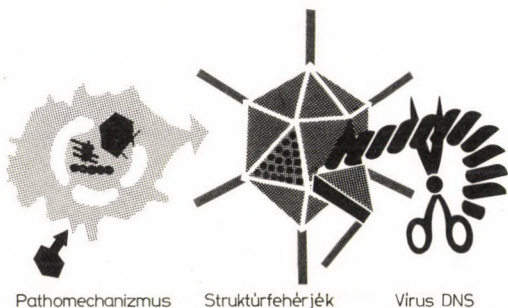
A II. táblázat az emberi adenovírusok csoportosítását szemlélteti. Az adenovírus család-

II. táblázat: Humán adenovírus szubgenuszok tulajdonságai

Szubgenusz	Szerotípus	Onkogenitás		DNS		Fiberek hossza	HA csoport
		állatban	sejttenyészetben	Homológia %	G/C tart. %		
A	12, 18, 31	magas	transzformál	48–69 (8–20)	47–49	18–31	IV.
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	közepes	transzformál	89–94 (9–20)	50–52	9–11	I.
C	1, 2, 5, 6	alacsony nincs	transzformál	99–100 (10–16)	57–59	23–31	III.
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30 32, 33, 36, 37, 38, 39	alacsony nincs	transzformál	95–99 (4–17)	57–60	12–13	II.
E	4	alacsony nincs	transzformál		57	17	III.
F	40						III.
G	41						III.

ban jelenleg 112-féle szerológiai típus ismeretes. Ezek közül 41 típus emberi eredetű, a többinek pedig különböző emlősök és madarak a természetes gazdái. Az emberi adenovírusok az emlős adenovírus genuszba (Mastadenovírus) tartoznak és az ábécé nagybetűivel jelzett szubgenuszokba sorolhatók. Az A szubgenuszba tartozó három típus a legerősebben onkogén, a B-be tartozók kevésbé onkogének, a többi szubgenuszba tartozók pedig alig, vagy egyáltalán nem onkogének *in vivo*, de daganatkeltő génekkel rendelkeznek és malignusan transzformálják a sejttenyészeteket *in vitro*. A különböző szubgenuszokba tartozó típusok között jelentős különbségek vannak a táblázatban feltüntetett paraméterekben, mint pl. a DNS-homológia, G/C tartalom stb. és természetesen a hexonok antigénszerkezetében is, amelyről később lesz szó.

Az adenovírusokkal végzett kutatásaink három fő témakörhöz tartoznak (4. ábra). Ezek a következők: 1. A vírusok kóroktani, patológiai szerepének vizsgálata a különböző sejtek és a szervezet szintjén, beleértve a pathomechanizmus tisztázására és a diagnosztika elősegítésére irányuló törekvéseket is (2, 18–29); 2. Az adenovírusok fehérjeburkát – kapszidját – felépítő különböző strukturfehérjék, a penton, a fiber és a hexon többirányú vizsgálata (11, 20, 22–24, 30–34); 3. Az adenovírus DNS szeparálása és összehasonlító vizsgálata, különböző restrikciós enzimekkel való emésztése, és



4. ábra. Adenovírus kutatási témakörök

a megfelelő restrikciós, illetve fizikális térkép meghatározása, a fragmentumok klónozása baktériumokban és expressziójának kiváltása (4, 35–42).

Szeretném hangsúlyozni, hogy az adenovírus-problémakör e három különbözőnek tűnő kutatási területe a valóságban szorosan összefügg, és várható, hogy a jövőben még inkább összefonódó, közös témakört fog jelenteni. Az alapkutatás jellegű DNS-manipulációs és vírusfehérje-kutatások, valamint a hibridomatechnika alkalmazása alapján ugyanis elvileg megnyílt a lehetőség olyan jó antigén tulajdonságú, tiszta fehérje komponensek mesterséges előállítására baktérium sejtekben, vagy szintetikus úton, valamint ezek ellenőrzésére monoklonális ellenanyagokkal, melyek az adenovírusok által okozott pathológiás állapotok prevencióját, diagnosztikáját, illetve terápiáját segíthetik a gyakorlatban, a klinikumban és az állatgyógyászatban egyaránt. Ez utóbbi

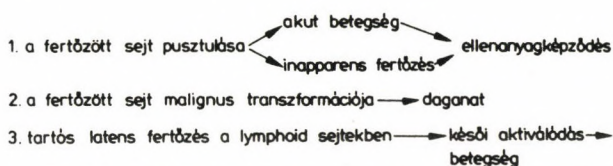
terület fontos gazdasági vonatkozásai miatt érdemel különös figyelmet. A másik közös jellemvonás mindhárom területen a kutatások szintjének molekuláris jellege. A különböző vírus-specifikus fehérjék és a vírus DNS-molekulák különböző részei szerepének, funkciójának a meghatározása is fontossá vált a pathomechanizmus kérdéseinek a kutatásában, a molekulárbiológiai és biotechnológiai módszerek alkalmazásával együtt.

A különböző mikrobák biotechnológiai alkalmazása már több területen gyakorlati hasznot hajt, vagy a közvetlen gyakorlati felhasználás megvalósítása folyamatban van, esetleg több vagy sokféle variációban. A biotechnológiai eljárások óriási gyakorlati jelentősége tehát nyilvánvaló. Nyomatékosan szeretném azonban hangsúlyozni, hogy semmivel sem kevésbé jelentősek a laboratóriumi – vagy mondhatni, hogy molekuláris – szintű biotechnológiai eljárások alkalmazásával nyert elméleti ismeretek (43). E módszerek révén annyi új tudományos ismeretanyag gyűlt össze (és ez napról napra tovább gyarapszik) az eukariota és prokariota sejtek, valamint a vírusok génjeinek szerkezetéről és működéséről, az általuk kódolt fehérjék, peptidek antigénszerkezetéről, a különböző immunológiai történésekről, hogy ezek az ismeretek szinte új fejezetet nyitottak a molekuláris biológiában, ill. a molekuláris virológiában. Előadásomban közvetve ezt is szeretném szemléltetni.

Mielőtt rátérnék az említett három témakörben végzett saját vizsgálataink néhány részleteinek ismertetésére, szeretnék köszönetet mondani munkatársaimnak áldozatos munkájukért. Intézetünk tagjai közül az előadásra kerülő munkák egy-egy részében a felsorolt munkatársak vettek részt: Ascher Zoltán, Ádám Éva, Berencsi György, Dán Pál, Dam Viet Coung, Farkas Judit, Geck Péter, Kang Wi Gyu, Kulcsár Gizella, Lengyel Anna, Ongrádi József, Takács Mária. A kísérletek egy-egy része együttműködésben folyt több hazai és külföldi intézet munkatársaival, akiknek szintén szeretném köszönetemet kifejezni.

Az adenovírus-fertőzések bonyolult pathomechanizmusa a modern molekuláris biológiai és biotechnológiai módszerek felhasználásával kapott eredmények tükrében új megvilágításba került és nagy fontosságra tett szert. A továbbhaladáshoz azonban a problémák új típusú tanulmányozására van szükség. A legtöbb esetben ugyanis nem egyszerűen arról van szó, hogy az adenovírus-fertőzés okoz-e vagy nem egy bizonyos betegséget. A kérdés ennél sokkal összetettebb. Mint az 5. ábrán látható, az adenovírus-fertőzés egyik következménye lehet a fertőzött sejt pusztulása és ennek eredményeképpen akut betegség létrejötte, lefolyhat a fertőzés inapparens formában, tünetmentesen is, azonban mindkét esetben létrejön a szervezetben az ellenanyag-termelődés. A fertőzés másik lehetséges következménye a vírus DNS

beépülése a sejtnukleinsavba, és az adenovírus-sal fertőzött sejt malignus transzformációja és rosszindulatú daganat képződése a szervezetben. A harmadik lehetőség pedig a tartós latens fertőzés kialakulása, főleg a lymphoid sejtekben, majd aktiváló tényezők hatására késői vírusszaporodás és akut betegség létrejötte, ill. egyéb betegség súlyosbítása. Mindez eddig viszonylag egyszerű, a probléma azonban rendkívül bonyolult, mert ezekért a különböző tör-



5. ábra. Az adenovírus fertőzés lehetséges következményei

ténésekért más-más vírusfehérje vagy polipeptid, ill. a vírus DNS más-más szakasza, génje a felelős és más-más mechanizmusokon keresztül, meghatározott molekuláris genetikai, molekuláris immunológiai szabályozás útján hat, amelyeket csak részben ismerünk; mindezeket még jelentősen befolyásolja a fertőzött gazdasejt, ill. a gazdaszervezet pillanatnyi állapota is, egészséges vagy legyengült volta, immunis vagy immunhiányos állapota.

A pathomechanizmus tanulmányozása során kimutattuk, hogy bizonyos tisztázatlan etiológiájú betegségekben szenvedők, mint amilyen pl. a szájnyálkahártya recidiváló feké-

lye, az asthma bronchiale, a cervix metaplasia, a grippe abdominalis, a colitis ulcerosa stb., latens adenovírus-hordozók, mert bár az ilyen betegek közül a vírus általában nem tenyészthető ki, a helyi laesiók sejtjeiben vagy a perifériás lymphocytákban a specifikus adenovírus antigének immunfluoreszcens eljárással folyamatosan magasabb százalékban mutathatók ki, mint a kontrollokéban. Ugyanezen betegek lymphocytái szenzibilizáltakká válnak a vírusantigénnel szemben, amit az mutat, hogy pl. a tisztított adenovírus hexon fehérje hatására magasabb arányú az ilyen betegek közül származó lymphocyták blasztos transzformációja, mint a kontrollokéból származóké (2, 4, 6, 25–28, 44–48).

Kísérleteink azonban ismételten felhívták a figyelmet arra is, hogy az egészségesek jelentős részének – mintegy 15–20%-ának – a lymphocytáiban is pozitívak az adenovírusok latens jelenlétére utaló reakciók. Nemrégén DNS–DNS hibridizációval és autoradiográfiás eljárással azt is sikerült kimutatni, hogy egészséges felnőttek perifériás lymphocytáiban a latens adenovírus típusok DNS-e részben a sejtnukleinsavba integrálódott, részben pedig szabad vírus DNS formájában van jelen, mégpedig sok esetben nem a teljes genom, hanem annak csak egy részlete. Bizonyos megfigyeléseink pedig arra utalnak, hogy az egészségeseknek látszó vírus-hordozókból kerülhetnek ki később a megbetegedettek (4).

A latencia további tanulmányozására és a reaktiválás lehetőségének és mechanizmusának vizsgálatára HEp-2 szövettenyészeteken mesterséges latens vírushordozást alakítottunk ki in vitro 5-ös típusú adenovírussal és ennek két hőérzékeny mutánsával, a ts 18-cal és ts 19-cel. Számos kémiai és természetes anyag vizsgálata során azt találtuk, hogy a natív és riodetoxikált E. coli O89 endotoxin képes reaktiválni mindhárom vírust permisszív hőmérsékleten, tehát 32 °C fokon, azaz képes vírus-replikációt indukálni a latens állapotból (III. táblázat).

III. táblázat: Endotoxinok hatása a latens adenovírusok reaktiválódására in vitro

Endotoxin E. coli O89	Ad h 5					
	vad törzs		ts18		ts19	
	32°C	39°C	32°C	39°C	32°C	39°C
Natív	+	+	+	—	+	—
Radio-detoxifikált	+	+	+	—	+	—

Vizsgálataink szerint ezenkívül az F típusú proszttaglandin (PGF₂α) szintén képes reaktiválódást kiváltani a vad típusnál és az egyik ts mutánsnál, feltehetően a vírusfehérjék foszforilálásának elősegítése révén (45).

Tanulmányoztuk az adenovírusoknak az egészséges emberi lymphocytákra in vitro kifejtett hatását is (IV. táblázat). Megállapítottuk, hogy az 5-ös típusú vírusfertőzés jelentő-

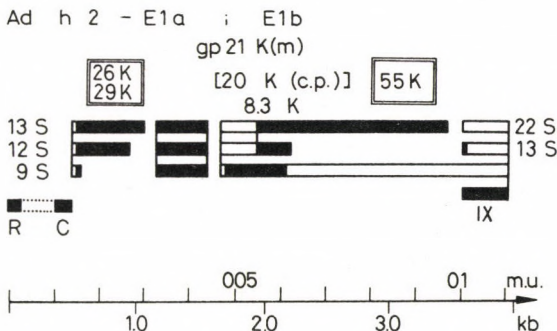
IV. táblázat: Az adenovírus fertőzés hatása a
lymphocytákra in vitro

E-rozetta képző aktivitás csökkentése

PHA (phytohemagglutinin) stimulálhatóság csökkentése

Lymphokin termelés indukálása

sen csökkenti a lymphocyták E-rozetta képző aktivitását és mintegy egytizedére redukálja a phytohemagglutininrel való stimulálhatóságát, azaz a blasztos transzformációt. A vírussal fertőzött lymphocyták olyan lymphokineket termelnek, amelyek csökkentik a polymorphonuklearis granulocyták phagocytáló képességét (49–52). Az adenovírus-fertőzés tehát képes megváltoztatni a lymphocyták több fontos tulajdonságát, ami különböző immunzavarokhoz vezethet, esetleg a daganatképzésben is jelentőséggel bírhat, különös tekintettel arra, hogy onkogén vírusról, ill. ennek a szervezetben való latens jelenlétéről van szó. Mint említettem minden adenovírus DNS rendelkezik onkogén DNS szakasszal, ez az onkogén szakasz az adenovírus DNS bal oldali részén foglal helyet és minden adenovírus típusban kb. azonos a szerveződése (1. 3. ábra). Az onkogén szakasz két részre osztható, amit Ela és Elb résznek neveznek (6. ábra). Az Ela szakasz olyan szabályozó géneket tartalmaz, amelyek működése a sejtek immortalizációjához, halhatatlanságához és részlegesen transzformált fenotípus létrejöttéhez vezet, az Elb szakasz pedig a teljes transzformált fenotípust fenntartó korai



6. ábra. Az adenovírus DNS daganatkeltő régiójának sematikus szerkezete

proteineket kódolja – a K-val jelzett számok ezeknek a molekulatömegét jelentik –, azaz a vírus-specifikus tumor- vagy T antigének megjelenéséért és a transzformált sejtek in vivo tumorkeltőkéességéért felelős (1, 3, 5, 53, 54). Ezek a korai antigének nem alkatrészei a vírusnak, de vírus-specifikusak és a tumort hordozók vérében velük szemben specifikus ellenanyag található.

Több mint 500, főleg urogenitális betegségben szenvedő beteg vérsavóját vizsgáltuk meg adenovírus elleni antitestek jelenlétére. Mint az V. táblázatból látható, rosszindulatú húgyivarszervi daganatokban szenvedőknél az erősen onkogén tulajdonságú 12-es típus korai antigénjei elleni antitestek 53%-ban, a nem daganatos urológiai betegek 18%-ában és a kontrollként vizsgált belgyógyászati betegek 4%-ában voltak kimutathatók (55–57).

V. táblázat: Vírusantigének elleni antitestek előfordulása

Vírus- antigének	Urogenitális tumor n=253	Urogenitális rendszer nem tumoros megbetegedései n=193	Belgyógyászati betegségek n=70
Ad h 12 korai	53%	18%	4%
Ad h 12 struktur	13%	6%	2%

Annak eldöntésére, hogy ezért a jelenségért a tumorsejtekben folyamatosan termelődő vírusfehérjék lehetnek-e a felelősek, in vitro komplementációs kísérleteket végeztünk a már említett hőérzékeny hiánymutánsokkal úgy, hogy a szövetkultúrához a vírusfertőzéskor daganatkivonatot is adtunk (VI. táblázat). A hőérzékeny mutánsok ugyanis restriktív hőmérsékleten, azaz 39 °C-on nem képesek szaporodni, csak abban az esetben, ha valahogyan megkapják azt a fehérjét, amely mutációjuk révén hiányzik. Szövettanilag is igazolt hólyag- és vese-carcinoma és egyéb urogenitális carcinoma sejtkivonatok hozzáadása esetén közel 60%-ban volt sikeres a komplementálás, bár a daganatsejtekben sohasem találtunk fertőző vírust. A kontrollként vizsgált nem malignus urogenitális betegek esetében mintegy 23%-ban volt pozitív a komplementálás. Ezekből az adatokból még korai volna kóroktani követ-

**VI. táblázat: Szövetkivonatok komplementáló képessége
hőérzékeny adenovírus mutánsokon**

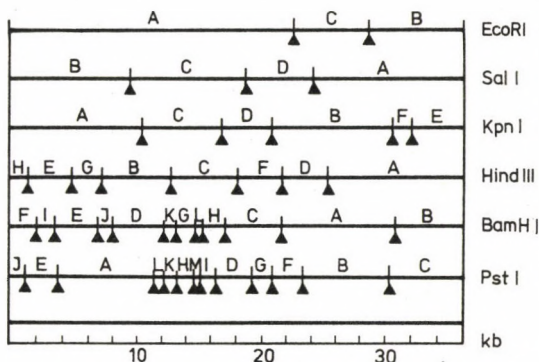
Szövetkivonat			Komplementálás		
Diagnózis	Eset- szám	ts 18+ ts 19	ts 18	ts 19	Összesen
Carcinoma vesicae urinae	37	15	5	6	26
Carcinoma renis	23	7	3	4	14
Egyéb uro- genitális car- cinoma	19	0	4	2	6
Összesen	79				46 (58,2%)
Nem malig- nus urogeni- tális betegsé- gek	56	1	4	8	13 (23,2%)

keztetéseket levonni, de annyi feltételezhető, hogy az adenovírus genom egy szakaszának folyamatosan működni kell, azaz bizonyos vírusfehérjéket kell termelnie a megfelelő daganatsejtekben. Ez magyarázhatja a sikeres komplementációt, a teljes genom jelenlétének hiánya lehet a magyarázata annak, hogy a daganatos szövetekben nem képződnek fertőző vírusrészecskék. Ennek a kérdésnek további tanulmányozásához szükséges azonban – többek között – az adenovírus DNS onkogén ré-

giójának a klónozása és termelése baktériumban, valamint ezek sokirányú kutatása. Ezeknek a régióknak – és más DNS szakaszoknak – a klónozását már több típusnál el is végeztük.

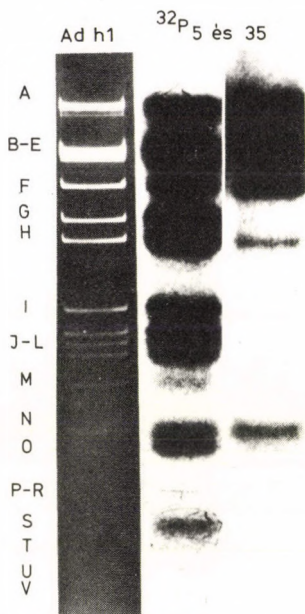
Több mint 200 olyan baktériumot sikerült klónozni, amelyekbe beépítettük a különböző típusú adenovírus DNS-ek egy-egy kisebb-nagyobb darabját, melyeket különböző restrikciós enzimekkel való emésztés segítségével nyertünk. Ezekben a klónozott baktériumokban a vizsgált típusok összes génjei benne vannak. Ezeket a géneket lényegében korlátozás nélkül tudjuk termelni bakteriális rendszerben, olcsón. Folyamatban van működési mechanizmusuk tanulmányozása és a szükséges további génmanipulációs módszerekkel a vírus fehérjetermelés megindítása a baktériumban. Meghatároztuk több adenovírus típus DNS-ének fizikális, vagyis restrikciós térképét számos különböző restrikciós enzimmel. E térképeknek a vírusok azonosításában, és az ún. molekuláris epidemiológiájának tanulmányozásában, ill. a vírus DNS összehasonlító vizsgálatában van nagy jelentősége (37, 40, 58). A 7. ábrán a „nevezetes” 35-ös típus DNS-ének hat különböző restrikciós enzimmel meghatározott fizikális térképei láthatók (59).

A különböző típusú adenovírus DNS-ek összehasonlító vizsgálatának már hagyományai vannak Intézetünkben. Összehasonlító DNS vizsgálatokat végeztünk az 1-es, 2-es 5-ös, 8-as és 12-es típusokkal, újabban pedig a 35-ös tí-



7. ábra. A 35-ös típusú humán adenovírus DNS-ének restrikciós térképei a jelölt enzimekkel

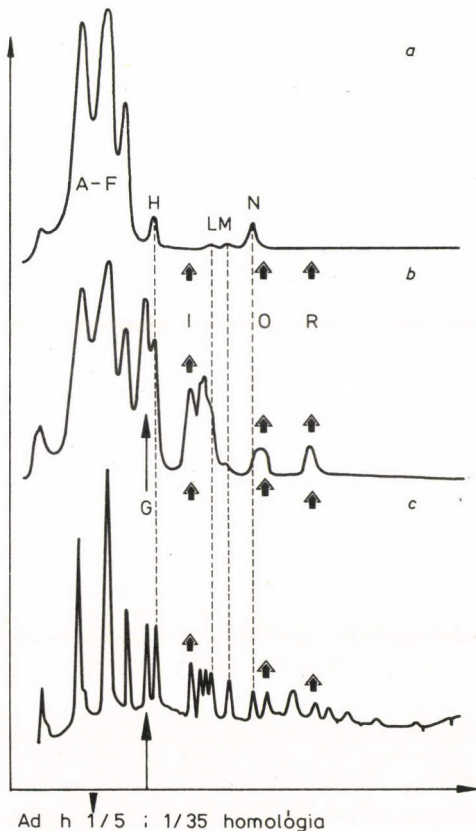
pusú adenovírusok DNS-ének vizsgálatára is rátértünk. DNS hibridizációs kísérletekkel összehasonlítottuk az 1-es, 5-ös és 35-ös típusú adenovírusok DNS-ét (59). A 8. ábra bal oldalán az 1-es típusú adenovírus DNS PstI enzim fragmentumai láthatóak, gél elektroforézis után, molekulasúly szerint lefelé csökkenő sorrendben; elnevezésük is eszerint történik az ábécé nagybetűivel. Ezeket a fragmentumokat nitrocellulóz filterhez kötöttük és foszforizotóppal jelzett 5-ös és 35-ös DNS-sel hibridizáltuk, majd autoradiográfiát végeztünk. Láthatjuk, hogy a PstI fragmentumai közül az A–F fragmentum jelentős azonosságot mutat az 5-ös és 35-ös típusok esetében az 1-es típusúval, a G és H fragmentumok esetén szintén erős a feketedés, ami a homológia magas fokára utal az 1-es és 5-ös típus között, a 35-ös



8. ábra. DNS hibridizációs kísérletek az 1-es, 5-ös és 35-ös típusú adenovírusokkal

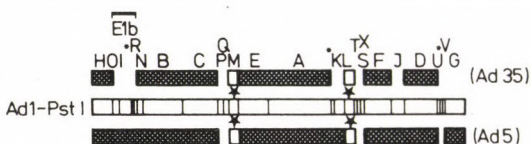
esetében csak a H frakciónál van egy kismértékű homológia. A G és H frakciók terminális fragmentumok, vagyis a DNS két végén helyezkednek el. A H fragmentum a 35-ös onkogén régiójának a bal szélén foglal helyet, tehát nagyjából az Ela régiónak felel meg. Az onkogén régió Elb részét alkotó I, O és R fragmentumokra szeretném még felhívni a figyelmet: az autoradiográfia homológiát mutat az 5-ös és az 1-es típus ezen fragmentumai között, a

35-ös esetében azonban ezeknél szabad szemmel nem látható homológia. Ezért az autoradiográfias vizsgálatokat még film-denzitometriás vizsgálatokkal is kiegészítettük. A 9. ábrán *a* a 35-ös, *b* az 5-ös, *c* az 1-es típus frag-



9. ábra. A 35-ös (*a*), az 5-ös (*b*) és az 1-es (*c*) típusú adeno-vírus DNS fragmentumainak film-denzitometriás görbéi

mentumainak film-denzitometriás görbéit mutatja. Látható, hogy az Ela frakciónak megfelelő H csúcs az 1-esnél és az 5-ösnél nagyjából egyforma, a 35-ösnél kisebb, az előbbiekének csak mintegy $1/4-1/5$ -e, ami egyezik az autoradiográfiás képen látottakkal, tehát mintegy 20%-os homológiát jelenthet a 35-ös és az 1-es, vagy az 5-ös típus között. Az Elb régióban, amit a vastag nyilak jelölnek, látható, hogy az 1-es és az 5-ös típus esetében van homológia, vannak az I, O és R fragmentumoknak megfelelő csúcsok, a 35-ös típusnál azonban nincsenek, vagyis nincs homológia. Ezzel tehát sikerült bizonyítanunk azt, hogy a 35-ös típus esetében az onkogén régió, legalábbis annak egyik fele, teljesen más összetételű, más típusú onkogén géneket tartalmaz. A teljes DNS-ek összehasonlítása során azt is kimutattuk, hogy nemcsak az onkogén szakaszon, hanem a 35-ös DNS más részein sincs homológia, amit a 10. ábrán a felső vastag vonal folyamatosságának a hiányai jelképeznek. Ez azért is érdekes, mert a 35-ös típus további vizsgálata közelebb vihet az onkogenitás és a nagy fokú és különleges latencia mechanizmu-



10. ábra. DNS homológia hiányok a 35-ös, 1-es és 5-ös típus között

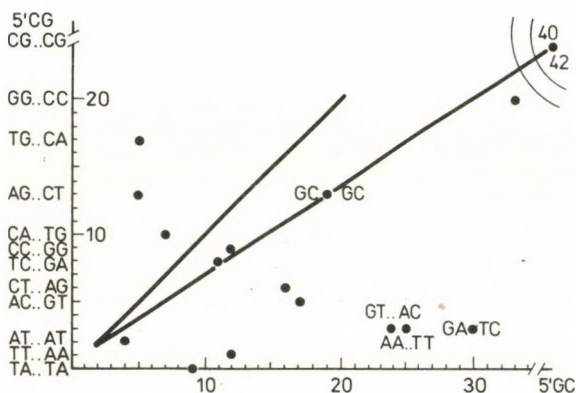
sának megismeréséhez, ugyanis időközben a 35-ös típus onkogén és más fragmentumait is sikerült baktériumban klónoznunk.

Az adenovírus genomok összehasonlító vizsgálata során megfigyeltük azt is, hogy bizonyos restrikciós endonukleázok aránytalanul kisszámú, mások igen nagyszámú metszésponttal rendelkeznek. A jelenség magyarázatának tanulmányozása céljából a 11. ábrán bemutatott GC/CG, egymáshoz viszonyított „fordított palindromok” előfordulását vizsgáltuk számítógéppel, betáplálva a 2-es adenovírus teljes DNS-szekvenciáját, ami 36 ezer bázispárt jelent. Palindromokról, vagyis tükörképi szimmetriáról akkor beszélünk, ha egy képzeletbeli függőleges tengely két oldalán egymással komplementer — tehát kötődni képes — nukleotidok fordulnak elő, mint pl. a citozin—guanin. A „fordított” palindromokban ugyanazok a nukleotidok fordulnak elő, csak az 5' vég felől nézve fordított sorrendben, és mindegyiket más-más enzim képes csak felismerni, mint a példán a Sal I és a Pvu II enzimpár. Ezek a fordított palindrom párok lehetőséget adnak annak vizsgálatára, hogy vajon vannak-e a 2-es típusú adenovírus DNS-ben olyan szakaszok,



11. ábra. CG—GC palindromok csoportjai

amelyek eukariota DNS jellegűek. Ugyanis az eukariota jellegű DNS-nek jellemző jegye az igen alacsony CG szomszéd előfordulás (60), a prokariota DNS-re pedig a CG és GC szomszédok kb. azonos gyakorisága jellemző. A 12. ábrán valamennyi elméletileg lehetséges hexanukleotid kombinációban feltüntettük a GC–CG

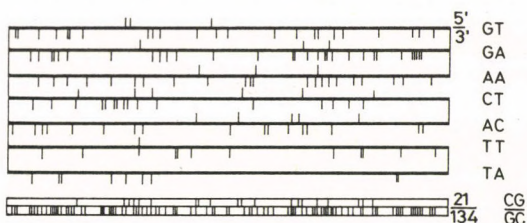


12. ábra. „Tükörkép” nukleotid-sorrendek és fordítottjaik száma az Ad h 2 DNS-en

palindrom-párt úgy, hogy a G–C középpontú pár gyakorisága az abszcisszán, a C–G közepű fordított változat előfordulási gyakorisága az ordinátán van. Eddig úgy véltük, hogy a 2-es típusú adenovírus DNS-ben a GC/CG párok gyakorisága csaknem azonos, kissé eltolódott a GC szomszédok javára, de a DNS lényegében prokariota jellegű. Nem volt tehát meglepő, hogy a vizsgált hexanukleotidok egy ré-

szének előfordulási gyakorisága megközelítőleg azonos mindkét palindrom formában, és lefelé kissé eltérve, de követi a vastagabban kihúzott vonal (az elméletileg számított értékek) lefutását, tehát 6 „fordított” enzimpár úgy viselkedik, mintha prokariota DNS-ben hasítana. Van azonban 14 olyan hexanukleotid sorrend, azaz 7 fordított palindrom-pár, amelyek előfordulási aránya olyan, mintha eukariota DNS-ben helyezkednének el (az alul elhelyezkedő 7 pont). Vagyis pl. a GA-TC nukleotid sorrend GC középpel 30-szor fordul elő a DNS-ben, CG középpel pedig csak háromszor.

Felmerül a kérdés ezek után, hogy ezek a metszéspontok csoportosulnak-e a genom valamelyik szakaszán, vagy egyenletesen oszlanak meg? Ezt a fizikális térképek összehasonlításával lehet eldönteni. A 13. ábrán tüntettük fel a 7 palindrom pár elhelyezkedését a DNS-en. A CG-közepűek helyét felfelé mutató vonalak, a GC közepűek helyét pedig lefelé mutató vonalak jelzik. Az alsó téglalapba húzott vonalak az összesített térképet mutatják. Látható, hogy

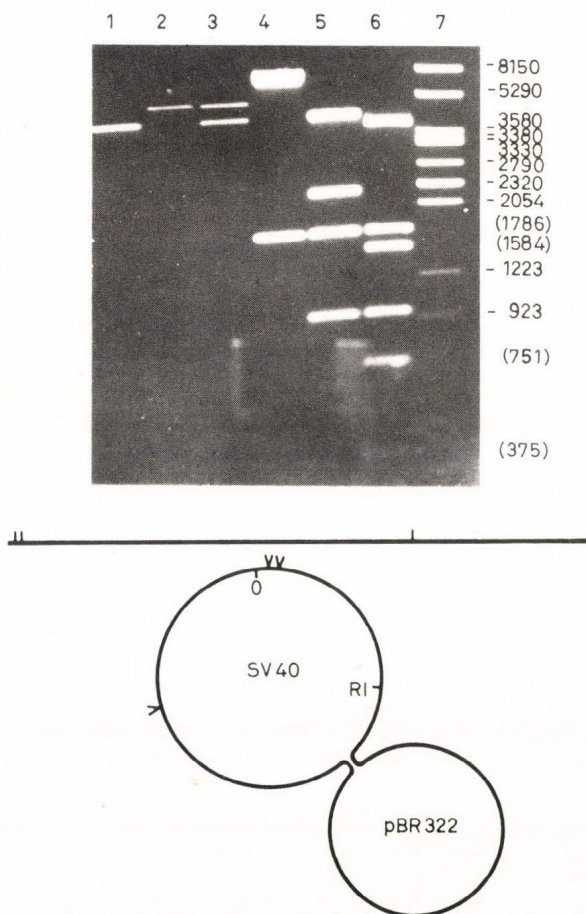


13. ábra. „Tükörkép” nukleotid-sorrendek és fordítottjaik elhelyezkedése a DNS-en

21 5' CG közepű hexanukleotidra 134 5' GC közepű hasítási hely esik, kisebb csoportosulásoktól eltekintve, megközelítőleg homogén eloszlásban. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az adenovírus genom pro- és eukariota jellegű DNS-töredékek mozaikszerű összekapcsolódásából alakult ki. Ez azért is érdekes, mert másirányú vizsgálataink során találtunk olyan sejteredetű – vagyis eukariota – DNS-fragmentumokat, amelyek szekvencia homológiát mutattak az adenovírus DNS bizonyos szakaszaival.

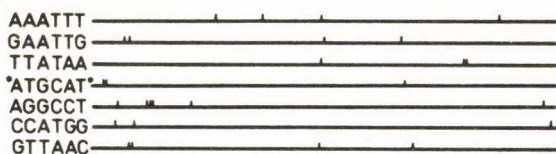
A következőkben – egy kis kitérővel – a vírus DNS kutatásaink egyik „melléktermékéről”, egy új restrikciós enzim felismeréséről szeretnék beszámolni, ugyanis egy streptococcus törzsben eddig ismeretlen specifikus restrikciós enzimaktivitást találtunk (61). Ezután természetesen kidolgoztuk az előállítás, izolálás, tisztítás módszereit, meghatároztuk az optimális működési körülményeket, amelyekre most nem térhetek ki. Ma már az új enzim előállítási technológiájának szabadalmaztatása, ill. az enzim kereskedelmi forgalomba hozatala is folyamatban van. Csupán az új enzim felismerési szekvenciájának meghatározásáról mondok néhány szót, amelyet számítógéppel végeztünk, az intézetünkben kidolgozott „szekvencia” elnevezésű program segítségével. A felismerési hely nukleotid szekvencia meghatározásának elve az enzimatiszta vágási térkép és a számítógépes fiktív térképek

összehasonlítása volt. SV40 vírus DNS-en meghatároztuk az új enzim (SmuCI) vágási helyeit és fizikális térképét. A 14. ábrán látható a 3



14. ábra. A SmuCI restrikciós endonukleáz vágási helyei az SV40 vírus DNS-en

vágási hely és ezek jellegzetes elhelyezkedése a cirkuláris és a lineárisra tett DNS-en. Az SV40 vírus teljes DNS-ének nukleotid szekvenciája ismert, ezt betápláltuk a számítógépbe, amely azt a feladatot kapta, hogy különböző adott hexanukleotid szekvenciákat keressen, lépésről lépésre haladva az SV40 DNS-en, és jelölje meg azok előfordulási helyét. Azt ugyanis más vizsgálataink alapján feltételezhettük, hogy hexanukleotid felismerési hellyel kell számolnunk. Az a megfontolás vezetett bennünket, hogy csak akkor találhatunk olyan fiktív számítógépes vágási helyeket, amelyek száma és elhelyezkedése azonos az enzimátikus vágási helyekkel, ha az enzim azt a hexanukleotid szekvenciát ismeri fel, amelyet a számítógép mutat az adott térképnél. Találtunk is ilyet, a 15. ábrán ez a



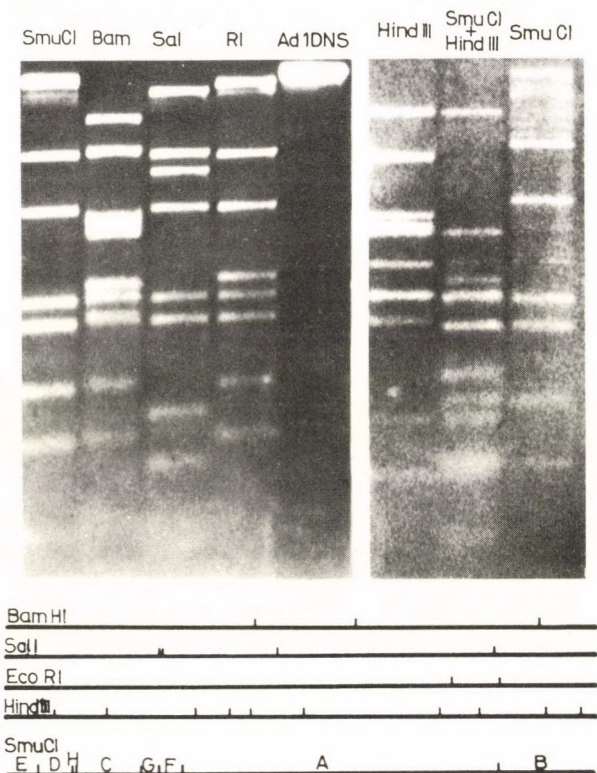
15. ábra. Számítógépes, fiktív fizikális térképek az SV40 vírus DNS-en

csillaggal megjelölt hexanukleotid. Több más kiegészítő vizsgálattal véglegesen sikerült bebizonyítani, hogy az új enzim felismerési szekvenciája ATGCAT, és a vágás 3' irányban az 5. adenin és a 6. timin között ún. ragadós végek létrehozásával történik (16. ábra). Ezzel



16. ábra. A SmuCI enzim felismerési szekvenciája

az új enzimnek minden lényeges molekulárbiológiai tulajdonságát meghatároztuk, és sor kerülhetett az adenovírus DNS kutatásban való alkalmazására is. Ennek első eredménye látható a 17. ábrán, ami az 1-es típusú adenovírus DNS restrikciós térképének meghatározása az új enzimmel. Először meghatároztuk, hogy az új enzimnek 7 metszési pontja van az adenovírus DNS-en, tehát hatására nyolc fragmentum keletkezik. A következő lépésekben meg kellett határoznunk a különböző nagyságú fragmentumok elhelyezkedési sorrendjét a DNS-en. Ez a 17. ábrán feltüntetett enzimekkel való emésztések, illetve keresztemésztések segítségével történt. A részletek az ábra felső részén láthatók. Amint az alsó vonalon látható, sikerült az új enzimmel, a SmuCI-gyel létrehozott fragmentumok fizikális térképét, természetes sorrendjét meghatározni a DNS-ben. Összegezésképpen, ezzel nemcsak egy új restrikciós enzim izolálása sikerült, hanem egy teljesen új restrikciós térkép meghatározása is a két vírus DNS-en, ami a vágási szekvenciák pontos elhelyezkedésének ismeretét is jelenti. Ez jelentős lépés az SV40 és adeno-

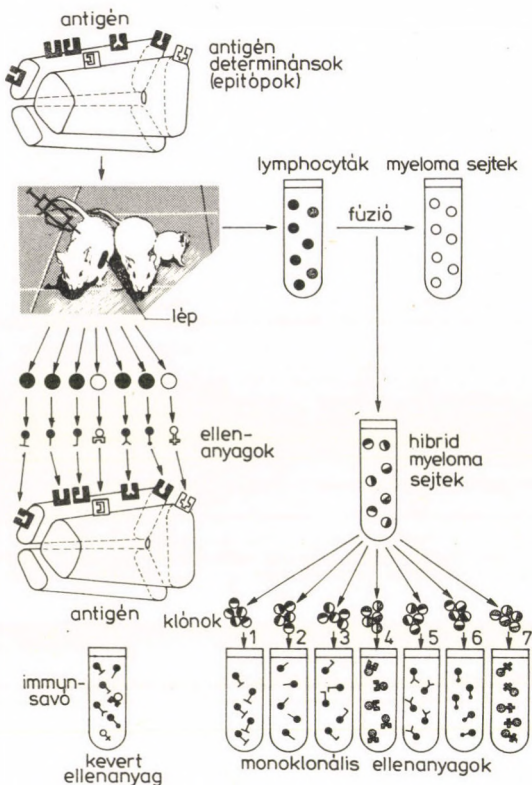


17. ábra. Az 1-es típusú adenovírus DNS restrikciós térképe a SmuCI enzimmal

vírus kutatásban, mert egy új, jelenleg teljesen egyedülálló markert ad a kezünkbe a vírusoknak a DNS útján történő azonosításához. Ma már ugyanis egy vírus pontos identifikálásához két dolog szükséges; az egyik a vírus nukleinsav különböző fragmentumainak és restrikciós

térképének, a másik pedig a vírusfehérjék antigénszerkezetének, epitóp térképének ismerete és meghatározása monoklonális ellenanyagok segítségével.

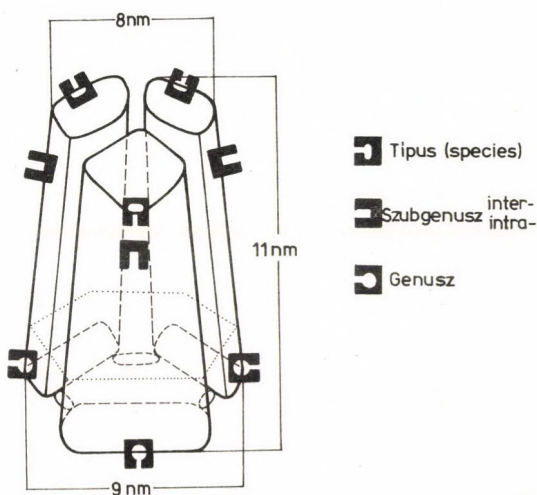
A következőkben az epitóp térképezésre vonatkozó vizsgálatainkról szeretnék számot adni. Intézetünkben hosszú évek óta folyik az adenovírus fehérjeburkát — kapszidját — felépítő, különböző struktúrfehérjék széles körű vizsgálata. Vizsgálataink fő tárgyát az adenovírusok már említett hexon fehérjei képezik, amelyeket sikerült kristályos formában is előállítanunk (12–14). Ezek a vírus fehérjeburkának mintegy 95%-át teszik ki; minden egyes vírusrészecskében 240 ilyen hexon fehérje molekula van. Mint a 18. ábra felső részén látható sematikus rajz mutatja, minden hexon molekula többféle antigén determinánst — epitópot — tartalmaz, amit a különböző négyzetekbe rajzolt különböző formátumok jelképeznek (30, 62–64). Természetesen, a három polipeptid alegységen lehetnek azonos, vagy konformáció-változás következtében eltérő epitópok is. Ha nagy fokban tisztított — akár kristályosított — hexon ellen kísérleti állatban immunsavót termelünk, akkor a megfelelő lymphocyták minden egyes epitóp ellen létrehozzák a megfelelő ellenanyagot, és ezek az állatból nyert immunsavóban, az ún. antihexon savóban, jelen lesznek, azonban kevert ellenanyag formájában (18. ábra). Ilyen poliklonális anti-hexon immunsavókkal végzett kísérletek alap-



18. ábra. Az adenovírus hexon fehérje többféle antigéndeterminánsa és az egyes epitópok elleni monoklonális ellenanyagok készítésének sematikus ábrázolása

ján annyit tudunk a hexon antigénszerkezetéről, hogy van egy olyan antigéndeterminánsa, epitópja, amely az emlős gazdával rendelkező adenovírus szerotípusok között közös, az emberi és állati adenovírusok egyaránt tartalmaz-

zák, tehát genusz-specifikus, van olyan epitópja, amely a különböző szerológiai típusoknál különböző, tehát típus-specifikus, és vannak utalások arra, hogy az egyes emberi szubgenuszokba tartozó különböző hexonok között közös, szubgenusz-specifikus epitópok is léteznek (19. ábra). Ezekről azonban további adatok nincsenek.



19. ábra. Az adenovírus hexon molekula sematikus szerkezete (nm = nanométer) és az epitópok poliklonális anti-hexon immunsavókkal meghatározott specificitása

A hibridóma technika teszi csak lehetővé a finomabb epitóp különbségek vizsgálatát. E célból a Debreceni Orvostudományi Egyetem Kórélettani Intézetének munkatársaival

együttműködve monoklonális ellenanyagokat készítettünk úgy, hogy Balb/c egereket immunizáltunk 1-es típusú humán adenovírus kristályosított hexon preparátumával és a lépéből nyert lymphocytákat Sp2/0 myeloma sejtekkel fúzionáltuk (l. 18. ábra). Az így létrejött hibrid myeloma, tehát a hibridoma sejtek a lymphocytáktól örökölték az egyféle, meghatározott ellenanyagtermelő képességüket, a myeloma sejtektől pedig a „halhatatlanságot”, azaz azt a tulajdonságot, hogy korlátlan ideig fenntarthatók és szaporíthatók. Monoklonális ellenanyagtermelés céljára szeparált, egyedi sejteket kell elszaporítani, azaz klónozni; az így nyert klónok tápfolyadékában, felülszójában már csak egyetlen epitópra specifikus, monoklonális ellenanyag található, amit a 18. ábrán a kémcsövekben a különböző alakzatok jelképeznek. Mintegy 3000 klón felülszóját vizsgáltuk meg indirekt ELISA-módszerrel; ezekből 60 klón bizonyult specifikus monoklonális ellenanyag termelőnek, 1-es típusú hexonnal vizsgálva. Ezeket az ellenanyagokat különböző szubgenuszokba tartozó, tehát heterológ adenovírus hexonokkal vizsgáltuk tovább, ELISA és passzív haemagglutinációs eljárással (65). Ezek összegezett eredménye alapján 39 specifikus keresztreaktivitási típust, azaz 39 különböző, vagy részben hasonló epitópot lehetett megkülönböztetni, amint a VII. táblázaton a vízszintes sorok mutatják; minden sor más-más reaktivitási típust jelent (66). A feke-

VII. táblázat: 60 monoklonális ellenanyag jellemzése

Hibridoma ellen- anyagok jele	Humán adenovírus speciestek szubgenuszok szerint									
	A	B	C				D			
	12 EH	7 EH	1 EH	2 EH	5 EH	6 EH	8 EH	9 EH	10 EH	13 EH
1A3	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
2C2, 6C5, H12	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●
5D1, A10	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●
5C5	○●	●●	●●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	●●
6C6	●●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	●●	●●	○●
5C1	●●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●
2A1, 2A6, 2D6	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●
2E3	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●
1B6	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	●●	○●
2A4	●●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
2A3	●●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1D3	●●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	○●	○●
1C1	●●	●●	●●	●●	○●	●●	●●	●●	○●	○●
5C6	○●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1B3	○●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	●●	○●
1B1	○●	○●	●●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	○●
1B2	○●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	●●	○●
1B5, 2C4, 5B1	○●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1C2	●●	○●	●●	●●	○●	●●	○●	●●	○●	○●
1D2	●●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	○●	○●
1A2, 2A5, 2C3	○●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1C5	○●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1A4, 1A6, 1D1, 2B1, 2B2, 2B3, 2B5, 2C1, 4D4	○●	○●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1A5	○●	○●	●●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
5D2	○●	●●	●●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
2D5	○●	●●	●●	○●	●●	●●	○●	●●	○●	○●
2C5, 2C6, 2D1, 2D2	○●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	○●	○●
2A2	○●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	○●	○●	○●
1D5, 1D6	○●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	●●	○●	○●
1A1	○●	●●	●●	○●	●●	○●	○●	●●	○●	○●
2D3	○●	○●	●●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1C4	●●	○●	●●	○●	●●	●●	○●	●●	○●	○●
5A1	○●	○●	●●	○●	●●	●●	●●	●●	○●	○●
1B4	○●	○●	●●	○●	○●	●●	○●	●●	●●	○●
1C6	○●	○●	●●	○●	●●	●●	○●	●●	○●	○●
6C1	○●	○●	●●	●●	○●	●●	○●	○●	○●	○●
5A6	○●	○●	●●	○●	○●	●●	○●	●●	○●	○●
1D1	○●	○●	●●	●●	○●	○●	○●	●●	○●	○●
2B4	○●	○●	●●	○●	○●	●●	○●	○●	○●	○●

● pozitív

○ negatív

te pontok pozitív reakciót jelentenek ELISA-val (E), ill. haemagglutinációval (H) az ábra felső részén látható adott hexon típusokkal. Az üres körök negatív reakciót jelentenek. A 60 hibridoma felülúszóval kapott eredmények azt mutatják, hogy az adenovírus hexonon messzemenően nagyobb számú és többféle specificitású epitóp van jelen, mint eddig ismeretes volt. Továbbá az is kiderült, hogy ezekkel az 1-es típusú hexon epitópokkal azonos, vagy hasonló epitópok egy része jelen van a különböző heterológ hexontípusokon is. Ezt az bizonyítja, hogy bár a monoklonális ellenanyagokat az 1-es hexon ellen készítettük, más típusokkal is reagálnak, mégpedig különböző ún. intertípusos kombinációkban, amelyek jellemzők az adott hexonra és egyben utalnak az 1-es típusú hexonhoz viszonyított antigén rokonsági fokozatra is.

Az antigénrokonság további vizsgálata során egerben termelt, monoklonális ellenanyagot tartalmazó 32 különböző hibridoma ascites esetében meghatároztuk, a keresztreaktivitási típus mellett, megfelelő képlet segítségével a keresztreaktivitás mértékét is, valamint ennek alapján a heterológ hexonok 1-es típusú hexonhoz viszonyított antigén rokonsági gradienst, sorrendjét. A VIII. táblázatról leolvasható, hogy a 32 ascitesből 29-nek a reaktivitási értéke a 2-es típusú hexonnál közelítette meg legjobban a homológ 1-esnél kapott reaktivitási értéket. Második helyen a 6-os szerepel 26-os,

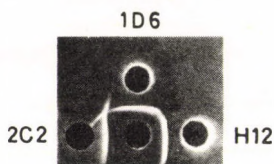
VIII. táblázat: Heterológ hexonok összesített reaktivitási sorrendje 32 ascites vizsgálata alapján

Hexon		Reaktivitási sorrend az 1-es típusú hexonhoz viszonyítva									
Szubgenusz	Típus	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
C	2	29	2			1					
	5	1	3	28							
	6		26	4	2						
D	8					1	9	5	5		
	9				27	3	2				
	10					2	5	9	6		
	13				2	16	7	5		1	
A	12						5	2	13	5	2
B	7	1				1	8	7	1	10	1
	35		1					1	5	3	13

a harmadikon az 5-ös 28-as értékkel. Ebből látható, hogy az 1-es típusúhoz antigénrokonság szempontjából legközelebb a C szubgenusz tagjai állnak, ebbe a szubgenuszba tartozik az 1-es típus is. Ezután viszont egyértelműen a D szubgenusz tagjai állnak legközelebb a C szubgenusz tagjaihoz és csak ezután következnek az onkogén tulajdonságú A és B szubgenusz tagjai. Ezek közül is legtávolabb a 35-ös típus áll (67, 68).

A monoklonális ellenanyagokat géldiffúziós vizsgálattal tanulmányozva kimutattuk, hogy azok egy része önmagában is képes precipitációs csíkot képezni a homológ és a heterológ

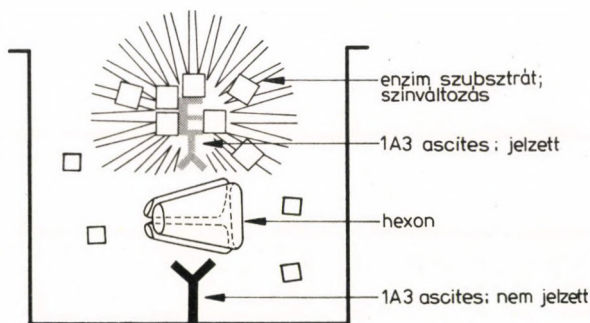
hexonokkal egyaránt, más részük azonban csak biklonális kombinációban reagált az antigénnel látható precipitációs csík formájában. A gélprecipitációs vizsgálatok alkalmasnak bizonyultak annak megállapítására, hogy az ellenanyagok azonos vagy eltérő epitóp ellen termelődtek-e, valamint annak igazolására is, hogy specificitásuk térbelileg eltérő helyzetű epitópokra jellemző. Sikerült meghatároznunk ugyanis, hogy a hexon antigén két precipitációs csíkot és kettős „sarkantyút” képez, ha két olyan monoklonális ellenanyaggal vizsgáljuk, amelyek két különböző epitóp ellen irányulnak. A 20. ábrán jól látható a kettős „sarkantyú” a 2C2 és az 1D6 jelű monoklonális



20. ábra. Az 5-ös típusú adenovírus hexon (alsó, középső rezervoár) géldiffúziós vizsgálata három különböző monoklonális ellenanyaggal

ellenanyagok között, míg a H12 és az 1D6 jelű monoklonális ellenanyagok összefolyó, folyamatos precipitációs csíkokat képeznek. Ez a jelenség arra mutat, hogy az előbbi két ellenanyag két különböző, az utóbbi kettő pedig azonos epitópra specifikus (67, 69).

A következő vizsgált kérdéskör annak meghatározása volt, hogy a komplett hexon molekula tartalmaz-e azonos epitópokból több példányt vagy sem? A kérdés eldöntésére kidolgoztunk egy ún. kettős monoklonális ellenanyag szendvics ELISA eljárást. Ennek az a lényege, hogy ugyanazt a monoklonális ellenanyagot használjuk elfogó és kimutató ellenanyagként. Mint a 21. ábrán látható, például a nem jelzett 1A3-as ellenanyagot adszorbeáljuk az ELISA lemez mélyedéseihez, mint elfogó ellenanyagot, ehhez adjuk hozzá a megfelelő hexon preparátumot, amely csak ahhoz az epitóphoz képes kötődni, amelyre az adott ellenanyag, jelen esetben az 1A3 jelű, specifikus. Ezután adjuk hozzá ugyanennek a monoklonális ellenanyagnak a peroxidázzal jelzett változatát. Mivel ennek a specifitása természetesen ugyanaz, ez a már kötődött hexonnak egy másik azonos (vagy erősen rokon), de még sza-



21. ábra. Kettős monoklonális ellenanyag szendvics ELISA

badon levő epitópjához képes csak kötődni. Következésképpen pozitív reakció — amit a hozzáadott enzim-szubsztrát színváltozása jelez — csak akkor jöhet létre, ha legalább két (vagy több) azonos epitóp található a hexon molekulán. Mint a IX. táblázaton látható, ilyen vizsgálatokat 4 monoklonális ellenanyag peroxidázzal jelzett és nem jelzett formájával, valamint 11 hexontípussal végeztünk — köztük a 35-ös típussal — úgy, hogy a pozitivitás mellett meghatároztuk a legkisebb kimutatható hexonkoncentrációt is. Mint látható, az ellenanyagok keresztreaktivitási spektrumának megfelelő pozitív eredményeket kaptunk nemcsak a homológ 1-es, hanem — kissé magasabb koncentrációban — a heterológ hexontípusokkal is. Ez egyértelműen bizonyítja az azonos epitópoknak legalább két, esetleg több példányban való létezését, nemcsak a homológ, hanem a heterológ hexon molekulákon is. Mivel a négy különböző monoklonális ellenanyag négy egymástól eltérő epitópot ismer fel, ezek az eredmények négy különböző epitópnak legalább két példányban való jelenlétét bizonyítják a homológ és a heterológ hexon molekulákon egyaránt, bár természetesen nem mindegyik van jelen minden típuson, mert pl. a 35-ös típuson csak az 1A3-as epitóp volt kimutatható több példányban (70).

Végül a különböző monoklonális ellenanyagaink által felismert különböző epitópok lokalizációjára, egymáshoz viszonyított kölcsönös

IX. táblázat: Kettős monoklonális ellenanyag szendvics ELISA

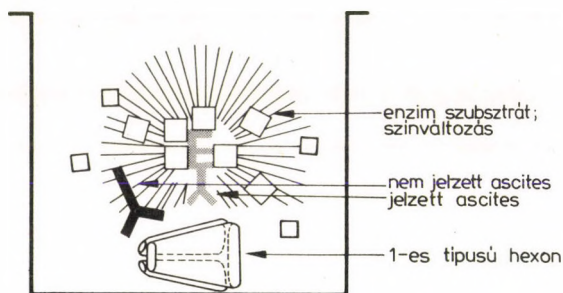
Monoklonális ellenanyagok		Humán adenovírus típusok szubgenuszok szerint										
		A	B		C				D			
Elfogó	Kimutató	12	7	35	1	2	5	6	8	9	10	13
1A3	1A3	0,1*	0,1	12,8	0,1	0,2	0,1	0,1	0,8	0,8	0,8	0,1
2A1	2A1	n.r.	1,6	—	0,025	0,025	0,025	0,025	3,2	3,2	6,4	0,4
2A6	2A6	n.r.	0,2	n.r.	0,006	0,0125	0,0125	0,0125	3,2	3,2	1,6	0,8
2B2	2B2	n.r.	n.r.	n.r.	0,05	0,2	6,4	0,1	—	—	—	—

*kimutatható legkisebb koncentrációk: $\mu\text{g/ml}$

n. r.: nem reagált

—: még 51,2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban sem reagált

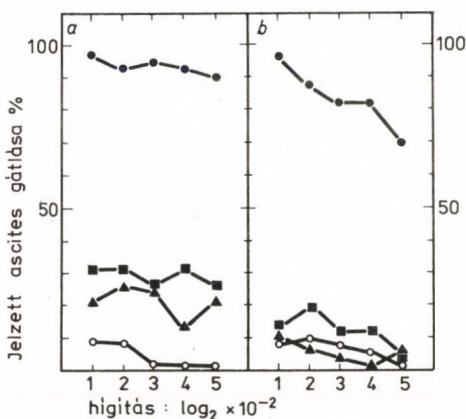
elhelyezkedésére a hexon molekulán, különálló vagy átfedő jellegükre vonatkozó vizsgálataink eddigi eredményeiről szeretnék beszámolni. Ezt a problémát az előbbieken is említett négy – peroxidázzal jelzett – monoklonális ellenanyag és 33 különböző, nem jelzett hibridoma ascites segítségével vizsgáltuk 1-es típusú hexonon ún. kompetitív vagy versenyeztető ELISA segítségével. Ennél az eljárásnál a hexont adszorbeáltatjuk először az ELISA lemezhez, majd a nem jelzett ascitesek különböző hígításainak hozzáadása után azonnal hozzáadjuk a jelzett ascites kititrált hígítását (22. ábra). Ha a nem jelzett ellenanyag speci-



22. ábra. Kompetitív ELISA monoklonális ellenanyagokkal

fikus vagy részben specifikus az adott epitópra, teljesen vagy részlegesen gátolja a jelzett ascites kötődését. Teljes gátlás – azaz negatív reakció – akkor jön létre, ha a versenyben részt vevő monoklonális ellenanyagpár azonos

epitóra specifikus, részleges gátlás részben átfedő vagy részben hasonló epitópokra utalhat. A 23. ábrán például az látható, hogy a nem jelzett 1A3-as ascites (a) és a 2C2-es (b) közel 100%-osan gátolta a jelzett 1A3-as, de nem gátolta a másik 3 jelzett ascites kötődését. Az 1A3 és a 2C2 jelű ascites tehát azonos epitóra specifikus, de ez az epitóp biztosan eltérő a másik három jelzett monoklonális ellenanyag által felismert epitópoktól. Végeredményben sok hasonló kompetitív vizsgálattal azt sikerült kimutatni, hogy a 33 ascites három különálló



Nem jelzett ascitesek: (a) 1A3; (b) 2C2

Jelzett ascitesek: ●—● 1A3; ▲—▲ 2A1
■—■ 2A6; ○—○ 2B2

23. ábra. Kompetitív ELISA. Négy, peroxidázzal jelzett monoklonális ellenanyag gátlási vizsgálata két nem jelzett

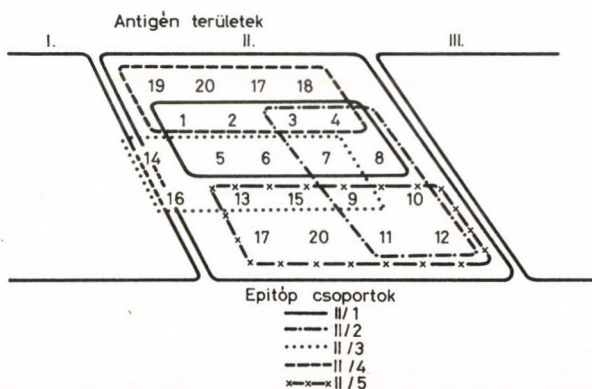
antigén területet tud megkülönböztetni (X. táblázat). A II. jelű antigén-helyen – melyet 25 ascites ismert fel – a teljes és különböző részleges gátlási típusok alapján öt epitóp csoport (cluster) volt elkülöníthető, amelyek ki-

X. táblázat: A kompetitív ELISA eredmények összefoglalása

Nem jelzett monoklonális ellenanyagok	A jelzett ellenanyagok gátlása				Antigén terület (site)	Epitóp csoport (cluster)
	1A3	2A1	2A6	2B2		
1A3, 2C2	++	—	—	—	I.	
2A6, 2D6, 1B2, 1B6	—	++	++	++		1
2A1	—	++	++	+		
1C5	—	++	+	++		
2B3, 2C3, 2C5, 2C6 1A5, 1C4, 2D1	—	+	+	++	II.	2
H12, 2B5, 2C1, 2C4, 2D2, 1A6, 1C1	—	+	+	+		
2B2	—	+	—	++		
1A2	—	+	—	+		3
1D4, 1D5	—	—	+	+		4
2A2	—	+	—	—		5
2A3, 2A4, 2A5, 2B1, 1D2, 1B5	—	—	—	—	III.	

++; teljes gátlás +; részleges gátlás —; nincs gátlás

sebb vagy nagyobb mértékben átfedők lehetnek. Ezt szemlélteti nagyon sematikusán a 24. ábra, amelyen az epitóp csoportok egyik lehetséges ún. „operációs” térképe látható. Kétoldalt van az I-es és III-as antigén hely, középen pedig a II-es, amelybe az öt epitóp clustert is berajzoltuk, szemléltetve a köztük feltételezhető összefüggéseket a különböző részleges gátlási típusoknak megfelelően. Egy-egy szám egy vagy két konkrét aminosavat jelképez, a bekeretezett részek pedig az epitóp csoportokat jelölik, de ezek mérete, alakja egyáltalán nem mérvadó és az átfedések jelölése is csak



24. ábra. Az epitóp csoportok feltételes „operációs” térképe

hozzávetőleges lehet. Folyamatban levő vizsgálataink során ugyanis (71) nemcsak négy, hanem 18 jelzett monoklonális ellenanyaggal dolgozunk. Így 18 ellenanyaggal van módunk

reciprok, azaz kölcsönös gátlási kísérleteket végezni, amelyeknek az eredménye még jelentősen befolyásolhatja az epitópok kölcsönös lokalizációjáról, ill. a köztük lévő összefüggésekről kialakult képet. Mégis az eddigi adatok arra utalnak, hogy ez az öt epitóp cluster részlegesen átfedő epitópokból áll és egy nagy immunodomináns régió része lehet az adeno-vírus hexon molekulán.

Az antigénszerkezetre vonatkozó vizsgálataink egyértelműen azt mutatják, hogy a hexon antigénszerkezete sokkal bonyolultabb, mint eddig gondoltuk, és feltétlenül szükséges egy új antigénrendszer kidolgozása, amelyhez monoklonális ellenanyagokkal kapott eredményeink megfelelő kiindulási alapot nyújtanak. A vírusbetegségek megelőzése, gyógyítása és gyors diagnosztikája terén a jövő útja a megfelelő vírusfehérje alkatrészek ún. protektív antigénjeinek a megismerése és előállítása, amelyek ellen a vírus pathogén hatását semlegesítő ellenanyagtermelés irányul a szervezetben. Ehhez hasonlóan a diagnosztikát az erre a célra egy-egy víruscsalád esetében legáltalánosabban használható diagnosztikus antigén előállítása segíti elő. Ezeknek a protektív és diagnosztikus antigéneknek az előállítása oltóanyag és diagnosztikum céljára történhet nagy határfokú tisztítási eljárásokkal vírusokból, de sokkal olcsóbb és a megfelelő gének ismeretében és eljárások birtokában sokkal egyszerűbb a génszintézeti úton való előállítás, vagy az

aminosav-szekvencia és -konformáció ismertetében a szintetikus előállítás, hiszen sok esetben rövid aminosav sorrendek is elegendők. Ezeknek a protektív és diagnosztikus antigén-determinánsoknak, epitópoknak a kiválasztásához, meghatározásához, feltérképezéséhez és előállítás utáni ellenőrzéséhez nélkülözhetetlen a nagy sorozatú monoklonális ellenanyagokkal való vizsgálat. E vizsgálatok gyakorlati jelentőségét az új tudományos alapismeretek szerzésén túlmenően ez adja meg. További céljaink között ezen a területen a monoklonális ellenanyagok közvetlen gyakorlati felhasználása mellett, segítségükkel a megfelelő hexon epitópok kiválasztása és azok aminosav-szekvenciájának meghatározása szerepel.

IRODALOM

1. NÁSZ, I., SZOMOLÁNYI, É. és BERENCSI, GY.: Az adenovírusok daganatkeltő génjeinek szerkezete és működése. In: *A biológia aktuális problémái* 32, Medicina, Budapest (1985) p. 39.
2. NÁSZ, I., KULCSÁR, G., DÁN, P. és SALLAY, K.: A possible pathogenic role for virus carrier lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 124, 214 (1971)
3. SZOMOLÁNYI, É. és NÁSZ, I.: Recombinant DNA technology in adenovirus research. *Acta Virol.* 28, 84 (1984)
4. NÁSZ, I.: Az adenovírusok és építőelemeik patológiai és biológiai szerepe. *Orvostudomány* 30–31, 107 (1979–80)
5. BERENCSI, GY. és NÁSZ, I.: Adenoviruses and human tumors: Regulation of eukaryotic chromatin structure? *Arch. Geschwulstforsch.* 53, 239 (1983)
6. FEKETE, G., KULCSÁR, G., DÁN, P., NÁSZ, I., SCHULER, D. és DOBOS, M.: Immunological and virological investigation in Down's syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 138, 59 (1982)
7. NÁSZ, I., BÉLÁDI, I. és LENGYEL, A.: *Az adenovírusok és kórokozó szerepük.* Akadémiai Kiadó, Budapest (1967)
8. NÁSZ, I. és BERENCSI, GY.: Transzformációja kletok i adenovirusznűj onkogen. *Vopr. Virusol.* 21, 643 (1976)
9. HORWITZ, M. S., VALDERRAMA, G., KORN, R. és SPIGLAND, I.: Adenovirus isolates from the urines of AIDS patients: Characterization of group b recombinants. In: *Acquired Immune Deficiency Syndrome.* Alan R. Liss, Inc., New York (1984) p. 187.
10. SHIELDS, A. F., HACKMAN, R. C., FIFE, K. H., COREY, L. és MEYERS, J. D.: Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 312, 529 (1985)
11. NÁSZ, I., BERENCSI, GY. és ÁDÁM, É.: Significance of viral peptides in medical biology. In: *Biomedical Significance of Peptide Research.* LÁSZLÓ, F. and ANTONI, F. Akadémiai Kiadó, Budapest (1984) p. 139.

12. ÁDÁM, É. és NÁSZ, I.: Electron microscopic studies on the crystallization of adenovirus hexon capsomers. *Intervirology* 13, 1 (1980)
13. ÁDÁM, É. és NÁSZ, I.: Electron microscopic studies on the arrangements of hexon polypeptides in a two-dimensional crystalline array. *Intervirology* 15, 37 (1981)
14. ÁDÁM, É. és NÁSZ, I.: Inter- and intrahexonal connections between adenovirus hexon polypeptides in the two-dimensional crystalline array. *Virology* 114, 265 (1981)
15. NÁSZ, I. és ÁDÁM, É.: Arrangement of hexons and polypeptide subunits in the adenovirus capsid. *Acta Microbiol. Hung.* 30, 169 (1983)
16. ÁDÁM, É. és NÁSZ, I.: Mutual orientation of peripentonal hexons and polypeptide subunits in the adenovirus capsid. *Arch. Virol.* 79, 299 (1984)
17. ÁDÁM, É. és NÁSZ, I.: Electron microscopic studies on the connections between capsomers in the adenovirus capsid. *Virology* 134, 233 (1984)
18. IMRE, GY., KORCHMÁROS, I., GECK, P., NÁSZ, I. és DÁN, P.: Antigenic specificity of inclusion bodies in epidemic keratoconjunctivitis. *Ophthalmologica* 148, 7 (1964)
19. NÁSZ, I. és TÓTH, M.: Antibodies against adenoviruses. *Lancet* i, 285 (1960)
20. NÁSZ, I., LENGYEL, A., DÁN, P. és KULCSÁR, G.: Haemagglutination by adenoviruses. *Lancet* ii, 717 (1961)
21. NÁSZ, I. és LENGYEL, A.: Haemagglutination-inhibiting antibodies against adenoviruses. *Lancet* ii, 1067 (1963)
22. NÁSZ, I., KULCSÁR, G., DÁN, P., LENGYEL, A. és CSERBA, I.: Znacsenie reakcii tormozsenija gemagglutinacii v diagnosztike epidemicseszkovo keratokonjunktivita. *Vap. Virusol.* 9, 112 (1964)
23. NÁSZ, I.: Immuno-osmophoresis and adenoviruses. *Lancet* i, 394 (1967)
24. NÁSZ, I., CSERBA, I. és RÓZSA, K.: Study of adenovirus type 5 antigens by immuno-osmophoresis. *Z. Immunitaetsforsch.* 131, 225 (1967)
25. SALLAY, K., KULCSÁR, G., DÁN, P., NÁSZ, I. és GECK, P.: Adenovirus isolation from recurrent oral ulcers. *J. Periodontol.* 44, 712 (1973)

26. NÁSZ, I., KULCSÁR, G., DÁN, P., SALLAY, K., VÉRTES, L., GECK, P., KESKENY, S. és HORVÁTH, J.: Vírusok kóroktani jelentőségének és a lymphocyták szerepének vizsgálata a tápcsatorna egyes betegségeinek pathogenezésében. *Orvostudomány* 23, 357 (1972)
27. SALLAY, K., KULCSÁR, G., DÁN, P., NÁSZ, I. és GECK, P.: A recidiváló szájfekélyek kóreredetéről. *Orv. Hetil.* 114, 1874 (1973)
28. KULCSÁR, G., DÁN, P., SALLAY, K. és NÁSZ, I.: Human lymphocyta transformatiós vizsgálatok vírusantigénekkal. *Kísér. Orvostud.* 24, 69 (1972)
29. KULCSÁR, G., SALLAY, K., NÁSZ, I., DÁN, P. és GECK, P.: Virusisolierungs-Experimente aus aphtösen Mundschleimhauterkrankungen. *Zentralbl. Bakteriol. I. (Orig. A)* 213, 455 (1970)
30. NÁSZ, I., LENGYEL, A. és CSERBA, I.: Comparative studies on adenovirus hexon antigens. *Arch. Ges. Virusforsch.* 36, 80 (1972)
31. NÁSZ, I., LENGYEL, A., ÁDÁM, É. és MEDVECZKY, P.: Az adenovírusok penton antigénjének vizsgálata. *Orvostudomány* 27, 219 (1976)
32. ÁDÁM, É. és NÁSZ, I.: Structure and aggregation of adenovirus hexon proteins. *Acta Microbiol. Hung.* 30, 83 (1983)
33. BERENCSI, GY., DYACHENKO, N. S., TARASSISHIN, L. A., VANTSAK, N. P., KOVALISHIN, G. G., KISELEVA, E. K., ZHOVNOVATAYA, V. Z., ÁDÁM, É. és NÁSZ, I.: Changes of adenovirus hexon associated with different passage history of Ad h 1. *Acta Microbiol. Hung.* 33, 233 (1986).
34. BERENCSI, GY., LENGYEL, A., DYACHENKO, N. S. és NÁSZ, I.: Polypeptides and immunoreactivity of empty adenovirus type 1 particles. *Acta Microbiol. Hung.* 30, 189 (1983)
35. NÁSZ, I.: Az adenovírus DNS fizikális térképezése és klónozása. *Orv. Hetil.* 123, 2941 (1982)
36. NÁSZ, I. és BERENCSI, GY.: Az adenovírus DNS molekulárbíológiai tulajdonságai és daganatkeltő képessége. *Orv. Hetil.* 116, 1503 (1975)
37. MEDVECZKY, P., ZAVIZION, B. A., BERENCSI, GY., CHAPLYGINA, N. M., SZOMOLÁNYI, É., NARO-

- DITSKY, B. S., NÁSZ, I. és TYKHONENKO, T. I.: HindIII restriction site map of the human adenovirus type 1 DNA. *Arch. Virol.* 67, 85 (1981)
38. PALKONYAI, L., BERENCSI, GY., GECK, P. és NÁSZ, I.: Possible causes of the loss of specific pBR322-Ad h 1 DNA recombinants following transfection. *Acta Microbiol. Hung.* 30, 179 (1983)
 39. BELÁK, S., BERENCSI, GY., RUSVAY, M., LUKÁCS, K. és NÁSZ, I.: DNA structure and hemagglutination properties of bovine adenovirus type 2 strains which bypass species specificity. *Arch. Virol.* 77, 181 (1983)
 40. TAKÁCS, M., BERENCSI, GY., LENGYEL, A. és NÁSZ, I.: Restriction site maps of the human adenovirus type 8 DNA. *Acta Virol.* 27, 289 (1983)
 41. RASSZULIN, YU. YU., BOBKOV, A. F., GARAEV, M. M., MEDVECZKY, P., PALKONYAI, L., BERENCSI, GY., NÁSZ, I. és TYKHONENKO, T. I.: Szozdanyie „bibliotek” vnutrennih fragmentov DNK adenoviruszov tipa 1 i 6. *Molekularnaja Genet. Mikrobiol. Viruszol.* 1, 15 (1983)
 42. GECK, P. és NÁSZ, I.: Concentrated digestible DNA after hydroxylapatite chromatography with cetylpyridinium bromide precipitation. *Anal. Biochem.* 135, 264 (1983)
 43. NÁSZ, I.: Biotechnológia és adenovíruskutatás. *Gyógyszerészet* 29, 49 (1985)
 44. DÁN, P., KULCSÁR, G., SALLAY, K. és NÁSZ, I.: Human lymphocyte transformation with virus antigens. *Blut* 22, 211 (1971)
 45. ONGRÁDI, J., KULCSÁR, G., DÁN, P., NÁSZ, I. és HORVÁTH, J.: Activation of adenovirus type 5 latent infections of tissue culture. *Intervirology* 14, 310 (1980)
 46. SALLAY, K., DÁN, P., GECK, P., KULCSÁR, G. és NÁSZ, I.: Immunfluorescent studies on circulating lymphocytes in oral mucosal disease. *Arch. Dermatol. Forsch.* 241, 15 (1971)
 47. SALLAY, K., KULCSÁR, G., NÁSZ, I., DÁN, P. és GECK P.: Adenovirus isolation from recurrent oral ulcers. *J. Periodontol.* 44, 712 (1973)
 48. DAM VIET CUONG, KULCSÁR, G., DÁN, P., HORVÁTH, J. és NÁSZ, I.: Human adenovirus infection in phytohaemagglutinin treated mice. *Acta Microbiol. Hung.* 31, 49 (1984)

49. SCHRANZ, V., KULCSÁR, G., DÁN, P., HORVÁTH, J., NÁSZ, I., BARINSZKY, I. F. és UGRYUMOV, J. P.: Interaction of human lymphocytes and viruses in vitro. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 26, 1 (1979)
50. HORVÁTH, J., DÁN, P., KULCSÁR, G., BUDAVÁRI, I., NÁSZ, I., ONGRÁDI, J. és HOPP, L.: Effect of adenovirus infection on human peripheral lymphocytes in vitro. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 27, 230 (1980)
51. ONGRÁDI, J., SALLAY, K., KULCSÁR, G., DÁN, P., HORVÁTH, J. és NÁSZ, I.: Absorption of viruses into oral lymphocytes and decreased antibacterial activity of oral polymorphonuclear leukocytes. *Acta Microbiol. Hung.* 31, 179 (1984)
52. HORVÁTH, J., KULCSÁR, G., UGRYUMOV, J. P., DÁN, P., NÁSZ, I., BARINSZKY, I. F., SIMON, GY. és ONGRÁDI, J.: Effect of adenovirus infection on human peripheral lymphocytes. *Acta Microbiol. Hung.* 30, 203 (1983)
53. BERNARDS, R. és VAN DER EB, A. J.: Adenovirus: Transformation and oncogenicity. *Biochim. Biophys. Acta* 783, 187 (1984)
54. BRANTON, P. E., BAYLEY, S. T. és GRAHAM, F. L.: Transformation by human adenoviruses. *Biochim. Biophys. Acta* 780, 67 (1985)
55. KULCSÁR, G., CSATA, S., DÁN, P., HORVÁTH, J., NÁSZ, I., ONGRÁDI, J. és VEREBÉLYI, A.: Onkogén tulajdonságú adenovírus antitestek vizsgálata az urogenitalis rendszer tumoros és egyéb betegeiben. *Magy. Onkol.* 25, 181 (1981)
56. CSATA, S., KULCSÁR, G., DÁN, P., HORVÁTH, J., NÁSZ, I., VEREBÉLYI, A. és ONGRÁDI, J.: Immunological and virological studies of patients with tumours of the urogenital system. *Acta Chir. Hung.* 26, 119 (1985)
57. CSATA, S., KULCSÁR, G., HORVÁTH, J., NÁSZ, I., ONGRÁDI, J. és VEREBÉLYI, A.: Study of antibodies to adenoviruses in patients with tumors of the urogenital system. *Int. Urol. Nephrol.* 14, 115 (1982)
58. WADELL, G.: Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110 (1984)
59. KANG, W. GY.: Molecular cloning and comparative analysis of the genom of adenovirus type 35 DNA. *Ann. Immunol. Hung.* 26, 1003 (1986)

60. CLADARAS, C. és WOLD, W. S. M.: DNA sequence of the early E3 transcription unit of adenovirus 5. *Virology* 140, 28 (1985)
61. GECK, P. és NÁSZ, I.: A new site specific endonuclease from *Streptococcus mutans*: Restriction endonuclease SmuC I. In preparation.
62. LENGYEL, A. és NÁSZ, I.: Soluble components of adenovirus type 8. *J. Virol.* 6, 406 (1970)
63. PETTERSON, U. és WADELL, G.: Antigenic structure of the adenoviruses. In: *Immunochemistry of Viruses. The Basis for Serodiagnosis and Vaccines*. Eds: VAN REGENMORTEL, M. H. V. and NEURATH, A. R. Elsevier, Amsterdam (1985)
64. WIGAND, R., BARTHA, A., DREIZIN, R. S., ESCHE, H., GINSBERG, H. S., GREEN, M., HIERHOLZER, J. C., KALTER, S. S., McFERRAN, J. B., PETTERSON, U., RUSSELL, W. C. és WADELL, G.: Adenoviridae: Second report of the Adenovirus Study Group, Vertebrate Virus Subcommittee, International Committee on Taxonomy Viruses (ICTV). *Intervirology* 18, 169 (1982)
65. LENGYEL, A., ÁDÁM, É., NÁSZ, I., ERDEI, J. és FACHET, J.: A sensitive method for detection of polyclonal and monoclonal antibodies against the adenovirus hexon. *Acta Virol.* 29, 362 (1985)
66. ÁDÁM, É., ERDEI, J., LENGYEL, A., BERENCSI, GY., FACHET, J. és NÁSZ, I.: Delineation of antigenic determinants of adenovirus hexons by means of monoclonal antibodies. *Intervirology* 23, 222 (1985)
67. ÁDÁM, É., ERDEI, J., LENGYEL, A., KATONA, A., BERENCSI, GY., FACHET, J. és NÁSZ, I.: Reactivity of mouse ascitic fluids containing monoclonal antibodies directed against adenovirus hexon. *Acta Microbiol. Hung.* 32, 113 (1985)
68. ÁDÁM, É., LENGYEL, A., TAKÁCS, M., ERDEI, J., FACHET, J. és NÁSZ, I.: Grouping of monoclonal antibodies to adenovirus hexons by their cross-reactivity. *Arch. Virol.* 87, 61 (1986)
69. ÁDÁM, É., NÁSZ, I., LENGYEL, A., ERDEI, J. és FACHET, J.: Differentiation of adenovirus hexon epitopes with monoclonal antibodies by gel diffusion assays. *Mol. Immunol.* 22, 967 (1985)

70. ÁDÁM, É., NÁSZ, I., LENGYEL, A., ERDEI, J. és FACHET, J.: Multiple copies of identical epitopes on the adenovirus hexon. *Mol. Immunol.* 23, 755 (1986)
71. ÁDÁM, É., NÁSZ I., LENGYEL, A., ERDEI, J. és FACHET, J.: Determination of different antigenic sites on the adenovirus hexon using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 93, 261 (1987)

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó
és Nyomda Vállalat főigazgatója

Felelős szerkesztő: Maleczky Anikó

Műszaki szerkesztő: Kiss Zsuzsa

Terjedelem: 2,96 (A/5) ív

HU ISSN 0236-6258

88.17002 Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat

Felelős vezető: Hazai György



